

用 Fluo 3-AM 测定 2型糖尿病患者淋巴细胞内 Ca^{2+} 浓度及药物对患者胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

章 立 李新荣 徐 衡 张鉴棠

(南京铁道医学院生化教研室, 南京 210009)

摘要 用 Fluo 3-AM 为荧光探针, 测定 2型糖尿病患者淋巴细胞内 Ca^{2+} 浓度, 观察了肾上腺素、多巴酚丁胺、Bay K 8644 胰岛素等药物对胞内 Ca^{2+} 的作用机制。实验表明患者胞浆内 Ca^{2+} 浓度与正常人相比显著升高; 药物对胞内 Ca^{2+} 的刺激表明, 病人对外界钙激动剂更敏感。胰岛素能刺激胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 其作用机制是激活钙离子通道。肾上腺素不仅能激活钙离子通道, 也能促使钙从钙池中释放。上述研究也表明 Fluo-3 是有效的研究胞内 Ca^{2+} 变化的荧光探针。2型糖尿病的发生可能与 Ca^{2+} 浓度升高有关, 患者对外界钙激动剂更敏感。

关键词 细胞内游离钙; 2型糖尿病(NIDDM); 淋巴细胞; Fluo 3-AM

由信号传导缺陷造成的胰岛素抵抗是 2型糖尿病主要始发因素, 2型糖尿病可引起细胞内 Ca^{2+} 超负荷^[1~2]。 Ca^{2+} 是重要的细胞内信号分子, 在生命活动中起着十分重要的作用。 Ca^{2+} 的存在和激活与磷脂分解形成甘油二酯(DAG)和三磷酸肌醇(IP3), 以及 PKC 的激活等途径有关。本文研究了 2型糖尿病与 Ca^{2+} 的关系, 测定细胞内游离钙的含量及其变化。这有助于了解细胞功能的启动、加强或抑制, 提供它与疾病间关联的直接证据, 从而认识 Ca^{2+} 对正常生理反应的调节过程。同时观察了药物干预后 Ca^{2+} 的浓度改变, 为阐明药物作用的机制与环节, 寻找有效药物奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

正常人新鲜全血获自南京市中心血站, 按 WHO 标准确诊的初诊 2型糖尿病病人全血由八一医院内分泌科提供。采用与患者的年龄相应的正常人作对照组。

1.2 试剂及仪器

Fluo 3-AM Bay K 8644 购自 SIGMA 公司, Triton X-100 购自上海化学试剂厂(Rohm-Mass 进口分装), RF-540 荧光分光光度计。

1.3 胞内 Ca^{2+} 浓度的测定方法

1.3.1 负载 Fluo 3-AM 人细胞 分离正常人及 2型糖尿病病人新鲜全血, 制备人外周血淋巴细胞悬液。用台盼蓝和相差显微镜检查其存活程度, 确保活细胞占 90% 以上, 细胞数达 10⁶ 以上。淋巴细胞置于 2.0 ml 孵育缓冲液中。孵育方法参照 Mark A. Yorek 等人^[3]的方法, 略有改动。孵育缓冲液(含 50 mmol/L Hepes, 130 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl₂, 0.8 mmol/L MgSO₄, 1.0 mmol/L NaH₂PO₄ 和 5.5 mmol/L 葡萄糖, pH 7.4)。最后加入 1 mmol/L Fluo 3-AM 8 μl, 30℃ 水浴孵育 20 min。

1.3.2 洗涤细胞外 Fluo 3-AM 孵育后的淋巴细胞用洗涤缓冲液洗涤。洗涤液含 50 mmol/L Hepes, 130 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 1.0 mmol/L NaH₂PO₄ 和 5.5 mmol/L 葡萄糖(pH 7.4), 离心收集细胞。洗涤两次后悬浮于 2.0 ml 洗涤液中, 待测。

1.3.3 Ca^{2+} 浓度的测定 于激发波长为 490 nm, 发射波长为 529 nm 测定静息期和加入药物干预后的荧光值, 加入 100 μl 含 20% Triton X-100 和 20 mmol/L CaCl₂ 溶液, 测得 F_{\max} 。再加 200 mmol/L EGTA(pH 7.0) 100 μl, 得 F_{min} 。 Ca^{2+} 浓度可通过

下式计算: $[Ca^{2+}] = K_d ((F - F_{min}) / (F_{max} - F))$
Fluo 3-AM 的 K_d 值等于 $0.4 \mu\text{mol/L}$ ^[4-5]。

2 结果

2.1 Fluo 3-AM 的负载条件

2.1.1 温度对 Ca^{2+} 测定的影响 对同一标本来源的淋巴细胞,加入 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 Fluo 3-AM 后在 25°C 和 37°C 分别孵育 20 min,测其 Ca^{2+} 浓度。结果表明, 25°C 和 37°C 对 Ca^{2+} 浓度的测定影响不大,都能确保充分负载。由于温度升高分子运动随之增加,分子间相互碰撞可能会使荧光减弱,故实验中采用的孵育温度为 25°C 。

2.1.2 Fluo 3-AM 浓度对 Ca^{2+} 浓度测定的影响 在 25°C 温度下,对同一标本来源的淋巴细胞用 $1 \mu\text{mol/L}$ ~ $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 Fluo 3-AM 负载 20 min,测定不同浓度的荧光探针对 Ca^{2+} 浓度的影响。实验表明,在 25°C 下用 $1 \mu\text{mol/L}$ ~ $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 Fluo 3-AM 负载细胞对胞内 Ca^{2+} 浓度没有影响,但 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 Fluo 3-AM 不足以测

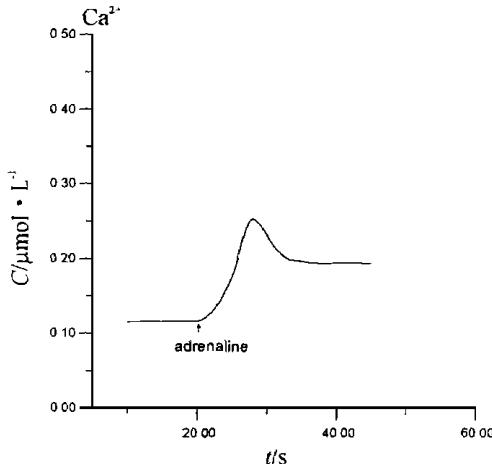


Fig 1. Typical figure of the effect of adrenaline on calcium release of healthy persons. ($n=7$)

$\geq 10^{-5} \text{ mol/L}$ 浓度的肾上腺素刺激正常人胞内 Ca^{2+} 浓度升幅为 $0.14 \mu\text{mol/L}$,而刺激患者 Ca^{2+} 升幅为 $0.19 \mu\text{mol/L}$ 说明患者胞内 Ca^{2+} 对肾上腺素更敏感。

2.3.2 多巴酚丁胺对正常人和患者胞浆内 Ca^{2+} 浓度的影响 以 10^{-4} mol/L 浓度的多巴酚丁胺分别刺激正常人及患者淋巴细胞,结果如图 3,4 所示: 多巴酚丁胺刺激胞内 Ca^{2+} 浓度升高,患者 Ca^{2+} 升高程度 $0.13 \mu\text{mol/L}$ 比正常人 $0.09 \mu\text{mol/L}$ 要大,说明患者对多巴酚丁胺更敏感。

出胞内 Ca^{2+} 。为使荧光探针充分负载入细胞,同时节约经费,我们采用 $4 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 Fluo 3-AM 负载细胞,对 Ca^{2+} 浓度进行测定。

2.2 2型糖尿病患者淋巴细胞内 Ca^{2+} 浓度的测定

25°C 下,用 $4 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 Fluo 3-AM 对细胞进行负载,测定 2型糖尿病患者与正常人胞浆内 Ca^{2+} 浓度,结果如表 1 所示。实验表明,2型糖尿病病人与正常人相比 Ca^{2+} 浓度有显著上升。

Tab 1. Effect of NIDDM on the concentration of Ca^{2+} in human peripheral blood lymphocyte

Group	n	$[Ca^{2+}] (\mu\text{mol/L})$
Health	21	0.142 ± 0.049
Patient	20	0.228 ± 0.072

* * $P < 0.05$

2.3 药物对胞浆内 Ca^{2+} 的刺激作用

2.3.1 肾上腺素对正常人和患者胞浆内 Ca^{2+} 浓度的影响 采用 $2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 浓度的肾上腺素分别观察正常人和患者淋巴细胞胞浆内 Ca^{2+} 浓度的变化,结果如图 1,2 所示。

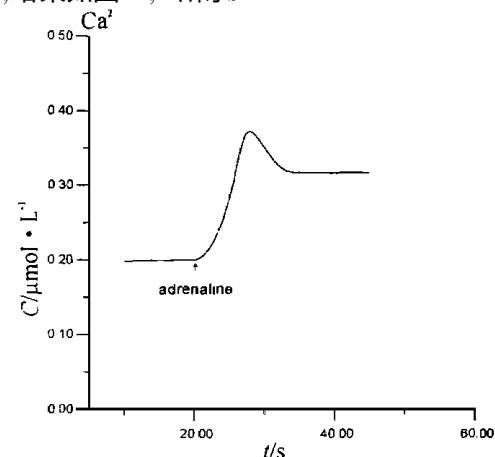


Fig 2. Typical figure of the effect adrenaline on calcium release of patients. ($n=6$)

2.3.3 Bay K 8644 对正常人和患者胞浆内 Ca^{2+} 浓度的影响 Bay K 8644 是钙离子通道激动剂 $5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 浓度的 Bay K 8644 对正常人和患者淋巴细胞的刺激作用如图 5,6 所示:

Bay K 8644 能够激活钙离子通道,使胞内 Ca^{2+} 浓度升高。在加入 $\geq 10^{-5} \text{ mol/L}$ 钙通道阻断剂维拉帕米后,再加入 Bay K 8644 则不能再激活钙通道。同样可以观察到,患者对 Bay K 8644 的敏感程度更高。

2.3.4 胰岛素、维拉帕米、肾上腺素对患者和正常

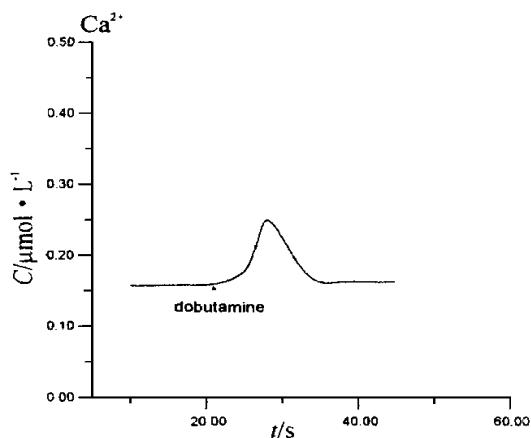


Fig. 3. Typical figure of the effect of dobutamine on calcium release of healthy persons. ($n= 6$)

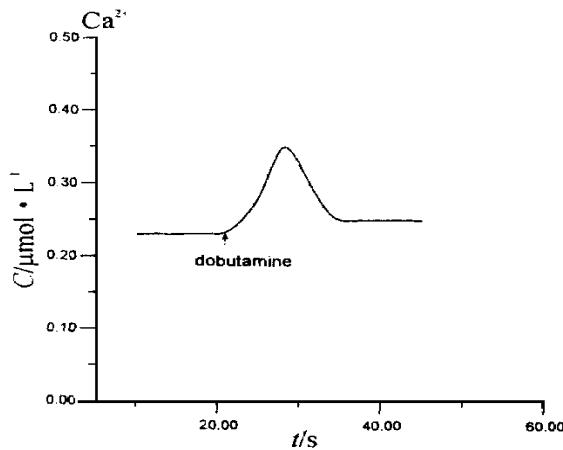


Fig. 4. Typical figure of the effect dobutamine on calcium release of patients. ($n= 7$)

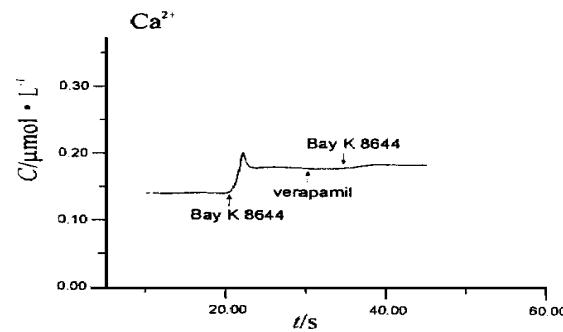


Fig. 5. Typical figure of the effect of Bay K 8644 on calcium release of healthy persons. ($n= 6$)

人胞浆内 Ca^{2+} 浓度的影响 观察了 2×10^{-5} mol / L 胰岛素对患者和正常人胞浆内 Ca^{2+} 浓度的影响 , 并加入钙离子阻断剂以观察胰岛素的作用机制。结果如图 7,8 所示 , 胰岛素能刺激胞浆内 Ca^{2+} 浓度升高 , 加入 2×10^{-5} mol / L 维拉帕米阻断钙离

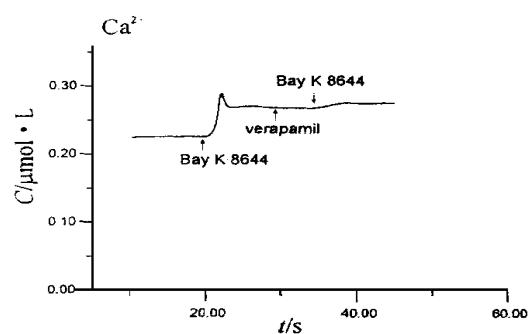


Fig. 6. Typical figure of the effect Bay K 8644 on calcium release of patients. ($n= 5$)

子通道后 , 再加入胰岛素则不能升高 Ca^{2+} 浓度 , 说明胰岛素的升钙机理是通过激活钙离子通道 在钙离子通道阻断后 , 加入 2×10^{-5} mol / L 肾上腺素 , 肾上腺素仍然能刺激 Ca^{2+} 浓度的升高 , 但升幅不如图 1 和图 2 所示的明显 , 说明肾上腺素的加入不仅能够激活钙离子通道 , 还能促进钙池内钙的外流。

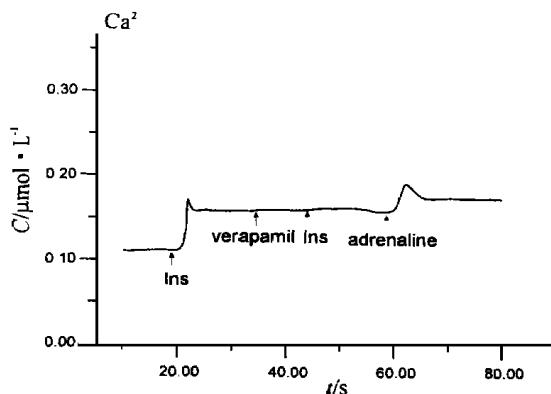


Fig. 7. Typical figure of the effect of drugs on calcium release of healthy persons. ($n= 7$)

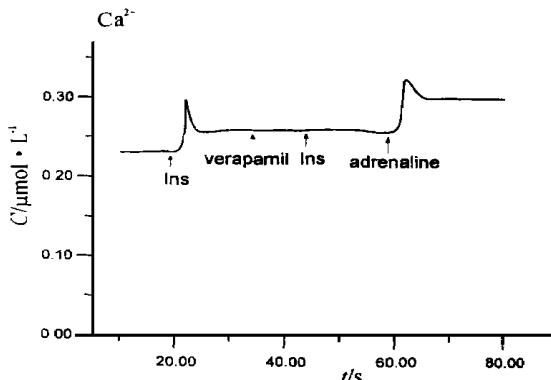


Fig. 8. Typical figure of the effect of drugs on calcium release of patients. ($n= 6$)

3 讨 论

利用钙荧光探针测定活细胞胞浆中游离 Ca^{2+} 浓度的方法在钙研究实验中已成为越来越重要的技术。Fluo-3是1989年合成的第三代荧光探针^[4],与前两代比有以下特点:(1)Fluo-3加上亲脂的乙酰羧甲基酯(AM)形式可直接负载进细胞;(2)用Fluo-3可连续地监测胞内 Ca^{2+} 的变化,适合于观察 Ca^{2+} 的空间分布和快速时间变化;(3)由于用可见光作为激发波长,避免了第一、二代荧光探针用紫外光激发对细胞产生的损伤和激发自身荧光的倾向;(4)Fluo-3的荧光信号可用任何一种荧光分光光度仪、荧光显微镜或流式细胞仪检查。本实验以Fluo-3为荧光探针,来测定胞内 Ca^{2+} 的变化。由于淋巴细胞的活性程度对钙的测定有重要影响,一个死细胞的 Ca^{2+} 浓度相当于10个活细胞的 Ca^{2+} 浓度,因而在测定前要检查细胞的存活程度。细胞功能正常情况下,Fluo-3-AM的负载是“全或无”效应,细胞间差异不大,测定的细胞数应达106以上。

Ca^{2+} 作为细胞内信使,其作用的分子基础是与钙调蛋白(CaM)结合形成 Ca^{2+} -CaM复合物,激活其靶酶。细胞内外钙离子相差悬殊,细胞外液含 Ca^{2+} 约为 10^{-3} mol/L,而胞浆只含有约 10^{-7} mol/L的 Ca^{2+} ,实际上细胞内 Ca^{2+} 主要储存于内质网和线粒体内,胞内外 Ca^{2+} 交流需借助于钙离子通道或钙泵的作用。一方面,细胞膜上离子泵可直接(Ca^{2+} -ATP酶, Na^+ / Ca^{2+} 交换)或间接(Na^+ - K^+ -ATP酶)将 Ca^{2+} 从胞浆转移到细胞外;另一方面细胞外 Ca^{2+} 可通过膜上钙通道进入细胞内,正常细胞通过这些机制使细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 维持在稳定的水平。临幊上出现高血压、胰岛素抵抗,NIDDM等时机体多数组织细胞胞浆内游离 Ca^{2+} 水平升高^[1-2]。导致这一现象产生的机制可能是一方面高血糖直接抑制 Ca^{2+} -ATP酶的活性^[6],使细胞外的 Ca^{2+} 进入细胞内。 Ca^{2+} -ATP酶活性被抑制是由于酶的糖基化,同时高糖也抑制了 Na^+ / Ca^{2+} 交换^[7]和 Na^+ - K^+ -ATP酶的活性^[8];另一方面,Demerdash等^[9]人研究发现PMNL的蛋白激酶C(PKC)在高浓度葡萄糖中被激活,激活钙通道,使 Ca^{2+} 从钙池(主要是内质网)中释放。

近年来对糖尿病和动物模型的研究表明,多数组织细胞胞浆内游离钙离子浓度升高,且这种改变

与糖尿病慢性并发症的发生和发展有一定关系。实验表明,2型糖尿病患者胞内 Ca^{2+} 浓度显著上升,这可能与 Ca^{2+} -ATP酶的失活和PKC的激活有关。

肾上腺素能激动(和)两种受体,多巴酚丁胺能选择地激动(1受体。实验表明,肾上腺素和多巴酚丁胺都能升高胞内 Ca^{2+} ,但对于2型糖尿病患者,二种药物升钙幅度更明显,说明病人对外界钙激动剂更敏感。胰岛素的加入使淋巴细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,同时在加入钙离子通道阻断剂维拉帕米后,胰岛素不能再刺激 Ca^{2+} 浓度的升高,说明胰岛素的升钙途径是通过激活 Ca^{2+} 通道。而在钙离子通道阻断后,加入肾上腺素,仍然能刺激 Ca^{2+} 浓度的升高,但升幅不如图1和图2所示的大,说明肾上腺素的加入不仅能够激活钙离子通道,还能促进钙池内钙的外流。此结果为从钙通道的角度寻找治疗2型糖尿病的药物奠定了基础。

参 考 文 献

- Barbagallo M, Gupta RK, Resnick LM. Cellular ions in NIDDM: relation of calcium to hyperglycemia and cardiac mass. *Diabetes Care*, 1996, **19**(12): 1393
- Resnick LM. Ionic basis of hypertension, insulin resistance, vascular disease, and related disorders. The mechanism of "syndrome X". *Am J Hypertens*, 1993, **6**(4): 123
- Yorek MA, Davidson EP, Dunlap JA, et al. Effect of bradykinin on cytosolic calcium in neuroblastoma cells using the fluorescent indicator fluo-3. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1177**(2): 215
- Minta A, Kao JP, Tsien RY. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem*, 1989, **264**(14): 8171
- Kao JP, Harootunian AT, Tsien RY. Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J Biol Chem*, 1989, **264**(14): 8179
- Barbagallo M, Shan J, Pang PK, et al. Glucose-induced alterations of cytosolic free calcium in cultured rat tail artery vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1995, **95**(2): 763
- Mene P, Pugliese G, Pricci F, et al. High glucose inhibits cytosolic calcium signaling in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int*, 1993, **43**(3): 585
- Alexiewicz JM, Kumar D, Smogorzewski M, et al. Elevated cytosolic calcium and impaired proliferation of B lymphocytes in type II diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis*, 1997, **30**(1): 98
- Demerdash TM, Seyrek N, Smogorzewski M, et al. Pathways through which glucose induces a rise in $[\text{Ca}^{2+}]$ of polymorphonuclear leukocytes of rats. *Kidney Int*, 1996, **50**(6): 2032

Determination of the Concentration of Intracellular Calcium in Lymphocyte by Fluo 3-AM and Study of the Influence of the Drugs on Calcium Release

Zhang Li, Li Xinrong, Xu Heng, Zhang Jiantang

Department of Biochemistry, Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009

Abstract The purpose of the research was to determine the intracellular calcium of patients of NIDDM. We also analyzed the mechanism of several drugs such as Adrenaline, Dobutamine, Bay K 8644 and Insulin which stimulated calcium release of NIDDM, using Fluo 3-AM as fluorescent probe. The results showed that the concentration of intracellular calcium increased compared with healthy persons. Patients are more sensitive to Ca^{2+} activator than healthy people. Insulin can stimulate calcium release which mechanism is to excite the Ca^{2+} channel. Adrenaline can not only excite the Ca^{2+} channel, but also stimulate the calcium release from Ca^{2+} pools. The part of Ca^{2+} in insulin signal transduction of NIDDM may have defects.

Key words Intracellular calcium; Type 2 diabetes mellitus or NIDDM; Lymphocyte; Fluo 3-AM

文摘 067 人血浆中奥美拉唑高效液相色谱测定法及其药代动力学研究 丁黎, 杨 劲, 闫花丽, 张正行, 安登魁. 药物分析杂志, 1999, 19(6): 300

目的: 建立人血浆中奥美拉唑的高效液相色谱法测定法, 以测定志愿者口服2种奥美拉唑制剂后的血药浓度, 并对2种制剂的生物等效性进行评价。方法: 血浆中加入内标尼美舒利后, 以乙醚提取, 进行高效液相色谱法检测。色谱柱为 Hypersil ODS 20 cm \times 4.6 nm, 5 μ m, 流动相为甲醇水-冰醋酸-三乙胺(60: 40: 0.5: 0.5), 流速 1 mL \cdot min $^{-1}$ 。检测波长为 302 nm。12名健康志愿者随机分成两组, 分别服用2种奥美拉唑制剂, 人体实验方案采用双交叉实验设计法。结果: 本测定方法提取回收率为 87.02%~98.07%, 血浆中奥美拉唑的最低检出浓度为 3 ng \cdot mL $^{-1}$, 线性范围为 5~1800 ng \cdot mL $^{-1}$ 。用本法测定了12名志愿者随机交叉口服单剂量 40 mg 洛赛克胶囊和奥美拉唑肠溶片后血浆中奥美拉唑的浓度经时变化过程, 并对其药动学参数进行估算。结论: 用本法测定人血浆中奥美拉唑浓度结果满意。奥美拉唑体内过程符合一室模型, 统计学结果表明2种制剂吸收程度相近。

文摘 068 草苁蓉化学成分的研究 易以军, 曹正中, 吴厚铭, 赵守训. 药学学报, 1999, 34(9): 686

目的: 研究我国民间草药草苁蓉 [*Boschniakia rossia* (Cham. et Schleidl) Fedtsch. et Flerov.] 的化学成分。方法: 草苁蓉全草醇提取物的乙酸乙酯部位经硅胶柱色谱和

制备薄层分离, 分得8个化合物。通过波谱和化学方法鉴定了它们的结构。结果: 8个化合物的结构分别鉴定为4,5,6-三羟基噢酮(1)、 β -谷甾醇(2)、 β -谷甾醇-3-O- β -D葡萄糖苷(3)、7去氧-8表马钱子酸(4)、没食子酸(5)、肉桂酸(6)、咖啡酸(7)和草苁蓉纳拉昔(8)。结论: 4,5,6-三羟基噢酮(1)为新的噢酮化合物, 4个已知化合物: 7去氧-8表马钱子酸(4)、没食子酸(5)、肉桂酸(6)、咖啡酸(7)为首次从草苁蓉中分得。

文摘 069 蛇床果实中香豆素类成分的变异及其规律 蔡金娜, 张亮, 王峰涛, 徐珞珊, 杜芳, 徐国钧. 药学学报, 1999, 34(10): 767

目的: 探讨蛇床果实种内香豆素成分的变异与地理分布的关系及其变异规律。方法: 用毛细管 GC 法对蛇床果实48个居群 59个样品中蛇床子素、佛手柑内酯、欧前胡素、O-乙酰哥伦比亚苷元等 9个香豆素成分进行含量测定与定性分析。结果与结论: 根据蛇床果实中香豆素成分化学结构的差异及各成分的有无与含量的高低结合地理分布, 可将蛇床分为3个类型。即化学型I: 以蛇床子素和线型呋喃香豆素为主要成分; 分布于福建、浙江、江苏等亚热带常绿阔叶林区域。化学型II: 以角型呋喃香豆素为主要成分; 分布于辽宁、黑龙江、内蒙古等温带针阔叶混交林区域。化学型III: 蛇床子素、线型和角型呋喃香豆素同时存在, 属于混合的过渡类型; 分布于河南、河北、山西等暖温带落叶阔叶林区域的过渡地带。